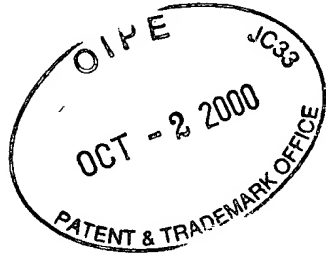


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

Das Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Mittel zur Sepsistherapie, seine Herstellung und seine Verwendung"

am 11. Juli 1997 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol A 61 K 38/57 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. Mai 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 197 29 810.9

Ebert

1 110707



Max-D Ibrück-Centrum für Molekulare Medizin

~~Belegexemplar~~
~~Darf nicht geändert werden~~

Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Reiner Schumann
und Dr. rer. nat. Norbert Lamping

Mittel zur Sepsistherapie, seine Herstellung und seine Verwendung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Sepsistherapie, seine Herstellung und seine Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin.

Die Sepsis mit ihren häufig letalen Komplikationen gehört zu den meisten gefürchtetsten und therapeutisch nicht beherrschbaren Krankheitsbildern in der Medizin und fordert jährlich mehrere 100.000 Todesopfer allein in den westlichen Ländern. Es muß dringend nach neuen Behandlungsmöglichkeiten gesucht werden, da Antibiotika zu langsam wirken und die Freisetzung bakterieller Toxine nicht verhindern, sie z.T. sogar verstärken. Die durch bakterielle Toxine ausgelöste Ausschüttung von Botenstoffen (Zytokine) durch den Wirtsorganismus ist das wichtigste Element der pathogenetischen Kaskade in der Entstehung des Krankheitsbildes der Sepsis. Verschiedene neue therapeutische Ansätze, zum Einen bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) als wichtigstes Toxin durch Antikörper zu blockieren oder die körpereigenen, sogenannten proinflammatorischen Zytokine zu antagonisieren versagten in großen klinischen Studien vollständig (C. Natanson et al., Ann. Intern Med. 120, 771-783 (1994)).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Mittel zur Sepsistherapie zu entwickeln.

Diese Aufgabe wird durch ein Mittel gelöst, das als wesentlichen Bestandteil das Lipopolysaccharid Bindende Protein LBP enthält.

Die Merkmale der Erfindung sind in den Ansprüchen 1-11 enthalten. Neben dem humanen LBP kann auch murines oder Kaninchen-LBP eingesetzt werden.

Die Struktur von LBP ist in Anlage 1 angegeben, seine Gewinnung erfolgt durch Isolierung eines Klons aus einer Akutphase cDNA Genbank, sowie anschließender Sequenzierung und Ableitung der Aminosäuresequenz. Rekombinantes LBP wird durch Klonierung der cDNA in einen Expressionsvektor sowie Ko-Infektion von Insektenzellen mit dem Baculovirus hergestellt.

Das klonierte LPS Bindende Protein (LBP) bindet hochaffin LPS und wird während der Sepsis als Akutphaseprotein ins Serum ausgeschüttet. Wie in den Ausführungsbeispielen gezeigt wird, hemmt LBP die LPS-Wirkungen und kann, wenn es Mäusen gegeben wird, die durch LPS ausgelöste Sepsis unterdrücken und die Letalität hochsignifikant reduzieren. Dies gilt bei Einsatz gleichzeitig mit der Auslösung der Sepsis, sowie vorher, was LBP für eine Sepsisprophylaxe geeignet erscheinen läßt. Da LPS auch bei der durch grampositive Bakterien ausgelösten Sepsis, sowie bei dem "systemic inflammatory response syndrome", einem durch Trauma ausgelösten, der Sepsis identischen Krankheitsbild, durch "Translokation" gramnegativer Darmbakterien eine zentrale Rolle spielt, kann die Hemmung der LPS-Effekte durch LBP auch diese dramatischen Krankheitsbilder verbessern.

Neben dem hochaktiven rekombinanten LBP sind für die Realisierung der Erfindung gleichermaßen geeignet funktionsveränderte und optimierte Mutanten, die ebenfalls als Sepsistherapeutikum eingesetzt werden.

Eine weitere grundlegende Möglichkeit zur Realisierung der Erfindung besteht darin, das klonierte LBP-Gen in einen adenoviralen Vektor mit hoher Leberaktivität hinter den starken

3 11.07.97

5

CMV-Promoter zu klonieren, um so einen Gentransfer nebst hepatischer Expression von LBP zu erreichen.

Die Erfindung ist anwendbar bei

- Sepsis ausgelöst durch gramnegative Bakterien
- Sepsis ausgelöst durch grampositive Bakterien
- Systemic inflammatory response syndrom (SIRS), ausgelöst durch Trauma und Verletzung

Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel und Abbildungen näher erläutert werden.

4 11.07.97

Die Gewinnung von LBP

Die komplette LBP cDNA wird in den pACHLT-B Vektor (Pharmingen, San Diego, USA) hinter den starken Polyhedrinpromoter und hinter die Glutathion S-Transferase (GST) cDNA kloniert, so daß ein GST-Fusionsprotein exprimiert wird. Es wird dann eine 500 ml Zellkultur von Sf-9-Insektenzellen mit diesem Vektor und der Baculovirus DNA („Baculogold“, Baculovirus DNA in linearisierter Form, ebenfalls von Pharmingen, San Diego, USA) infiziert. Die Zellen werden nach 2 Tagen lysiert und das Lysat wird im „batch“-Verfahren an Glutathion-Sepharose in Gegenwart von Triton X-100 gekoppelt. Durch Thrombinverdau wird dann LBP vom Fusionspartner abgespalten, gefolgt von einer Behandlung mit Calbiosorb zur Triton-Entfernung und einer Behandlung mit Benzamidin-Sepharose zur Entfernung von Thrombinresten. Die resultierende Konzentration von reinem LBP beträgt 0,3 - 0,5 mg/ml.

Legenden zu den Abbildungen

Abbildung 1: Eine murine Makrophagenzelllinie wird mit verschiedenen Konzentrationen des bakteriellen Toxins LPS in vitro zur Synthese des Sepsismediators TNF in Abhängigkeit von LBP stimuliert. Bei hohen, im Organismus nicht vorkommenden LPS-Konzentrationen beeinflusst LBP die TNF-Synthese nicht. Die Stimulation der Makrophagen durch niedrigere LPS-Mengen wird jedoch durch hohe LBP-Konzentrationen, wie sie während der Akutphase in vivo vorkommen und auch durch exogene Zugabe erzielt werden können, gehemmt.

Abbildung 2: Hier zeigt sich, daß die Zugabe von LBP in der Gegenwart von Serum ebenfalls die TNF-Produktion der Makrophagenzelllinie unterdrückt. Hierfür ist das im Serum befindliche LBP verantwortlich.

Abbildung 3: Wird die Serumkonzentration bei konstanter exogen zugeführter LBP-Menge erhöht, wird ebenfalls die TNF-Synthese unterdrückt.

5 1107.97

7

Abbildung 4: Hier wird gezeigt, daß die LBP-Spiegel in der Maus, die wir durch exogene Gabe erzeugen, den Akutphasespiegeln, die durch hohe LPS-Gabe erzeugt werden, entsprechen und somit physiologisch sind.

Abbildung 5: In der Maus kann durch gleichzeitige Gabe von LBP die LPS-induzierte Zytokinausschüttung unterdrückt werden. A: TNF, B: IL-6.

Abbildung 6: Desweiteren wird der durch LPS ausgelöste und durch den Anstieg des ALT-Enzym erfaßte Leberschaden durch die gleichzeitige Gabe von LBP unterdrückt.

Abbildung 7: Die Gabe von LBP reduziert signifikant die Letalität in einem LPS-Sepsismodell, durchgeführt mit 20 Mäusen pro Gruppe.

Kurze Interpretation:

Hochdosiertes LBP unterdrückt in vitro die durch das bakterielle Toxin LPS ausgelöste Synthese eines wichtigen Sepsismediatormoleküls, nämlich TNF. Die Produktion dieses Proteins und anderer Mediatoren wird in der Maus bei gleichzeitiger LBP-Gabe ebenfalls unterdrückt. Desweiteren wird der durch LPS-Gabe induzierte Leberschaden durch LBP verhindert und die Überlebenszahl der Mäuse signifikant erhöht. Die Gabe von LBP scheint also vor den LPS-Effekten in der Sepsis zu schützen und stellt somit ein neues therapeutisches Prinzip zur Behandlung der Sepsis dar.

14 11.07.97

9

Patentansprüche

1. Mittel zur Sepsistherapie, enthaltend das Lipopolysaccharid Bindende Protein (LBP), seine Varianten, Mutanten oder Hybridproteine
2. Mittel nach Anspruch 1, enthaltend humanes LBP
3. Mittel nach Anspruch 1, enthaltend murines LBP
4. Mittel nach Anspruch 1, enthaltend Kaninchen- oder Ratten-LBP
5. Mittel nach Anspruch 1, enthaltend die Hybridproteine LBP mit der LPS-Bindungsstelle des Bactericidal/permeability increasing proteins (BPI) bzw. LBP mit der LPS-Bindungsstelle des Limulus anit-LPS-Faktors (LALF)
6. Mittel nach Anspruch 1, enthaltend punktmutierte Varianten, die im Bereich der LPS-Bindungsstelle (Aminosäuren 91-101) durch einzelne Aminosäureaustausche funktionsverbessert sind.
7. Verfahren zur Herstellung des Mittels nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß im Baculovirussystem, sowie in CHO-Zellen LBP zunächst als Fusionsprotein exprimiert und dann durch den Fusionspartner mittels an sich bekannter Trennverfahren aufgereinigt wird
8. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-6a zur Therapie der durch gramnegative Bakterien ausgelösten Sepsis
9. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-6a zur Therapie der durch grampositive Bakterien ausgelösten Sepsis

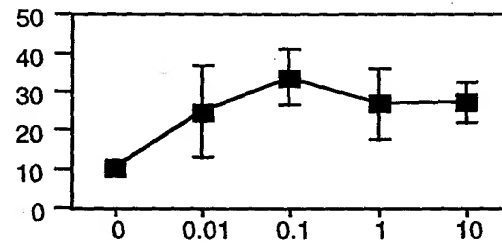
10. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-6 zur Therapie des durch Trauma und Verletzung ausgelösten SIRS.

11. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das LBP-Gen in einen adenoviralen Vektor hinter einen starken Promoter, vorzugsweise den CMV-Promoter, kloniert wird und anschließend ein Gentransfer in die betroffenen Leberzellen durchgeführt wird

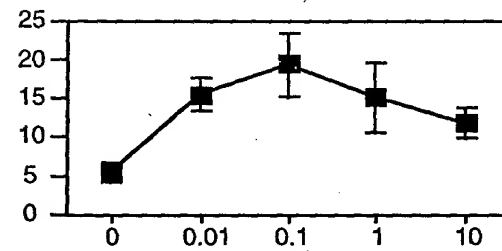
6 11.07.97

10

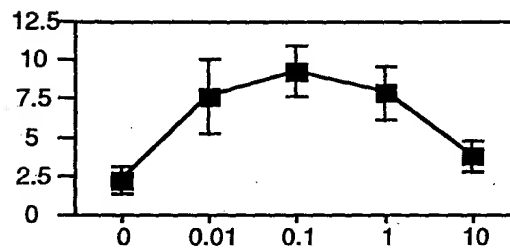
TNF- α (ng/ml)



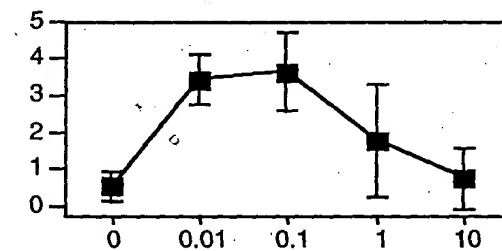
3 ng/ml LPS



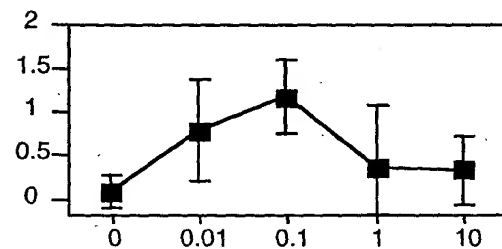
1 ng/ml LPS



0.33 ng/ml LPS



0.11 ng/ml LPS



0.037 ng/ml LPS

mLBP (μ g/ml)

Fig.1

7 11.07.97

11

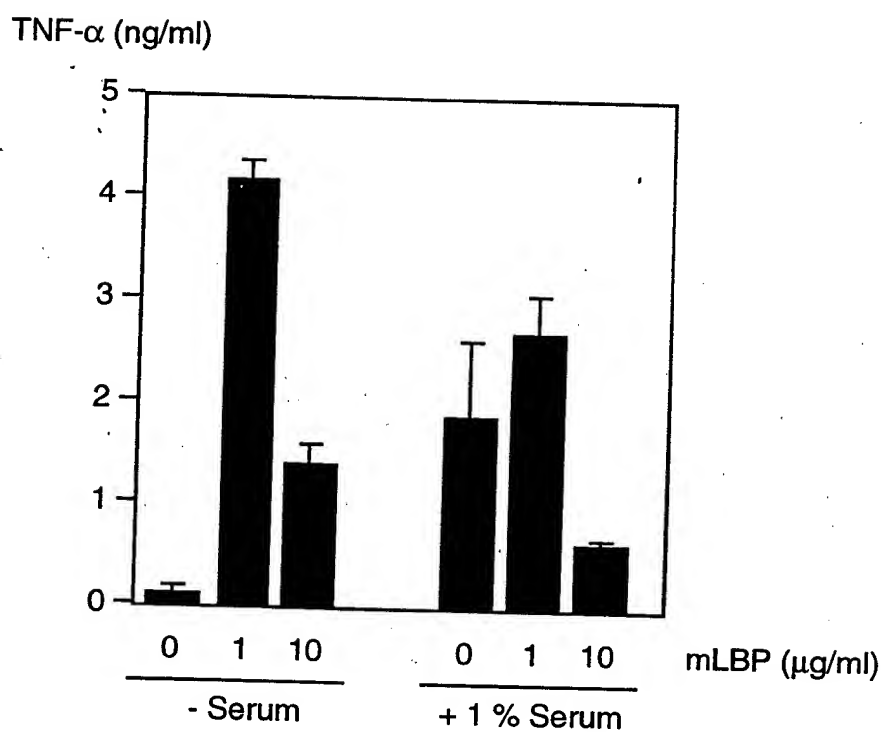


Fig.2

8 11.07.97

12

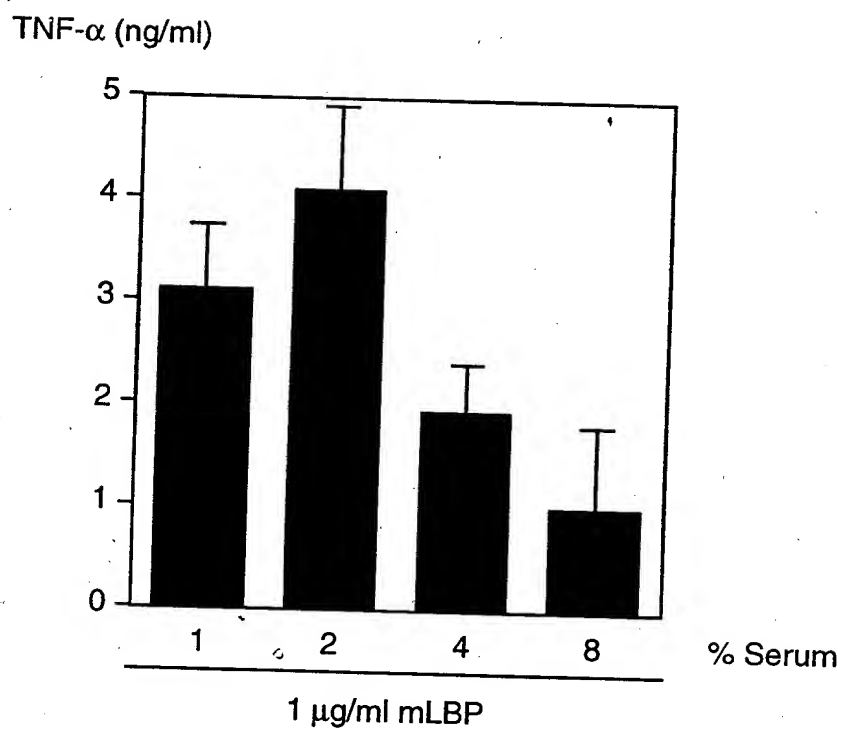


Fig.3

9 11.07.97

13

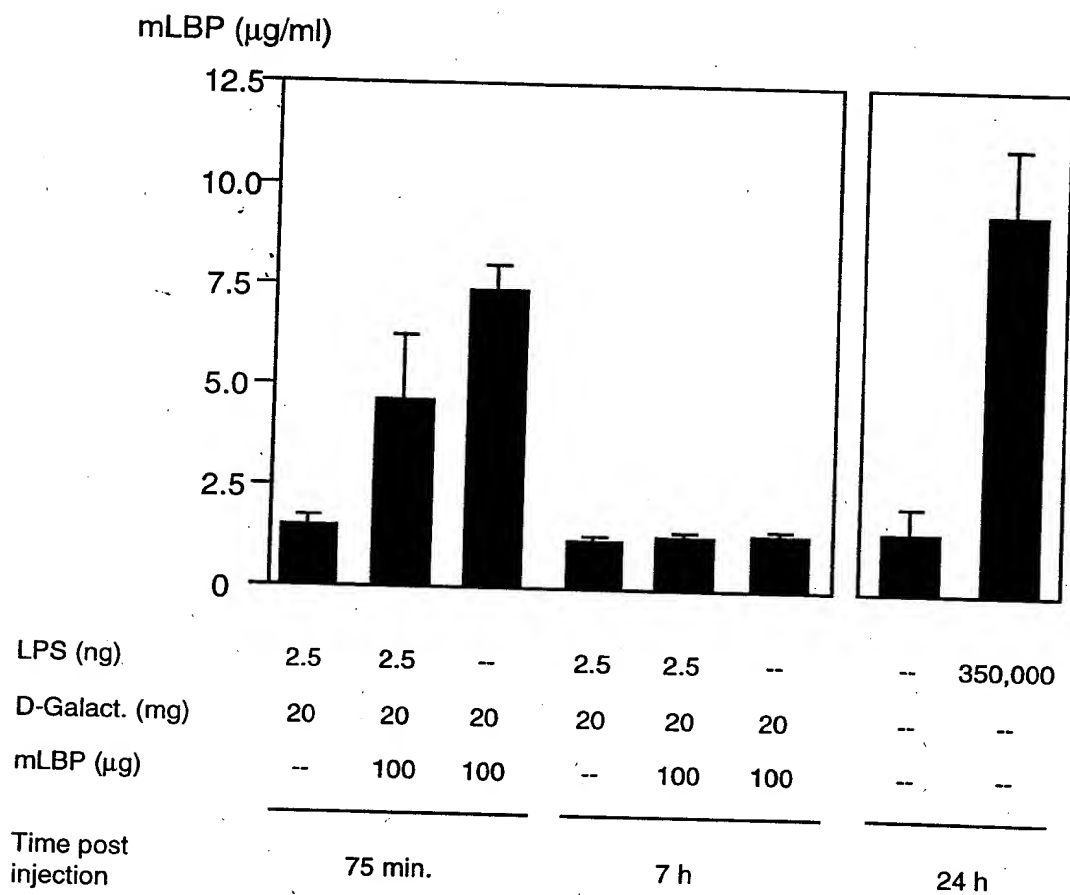


Fig. 4

11.07.97
10

14

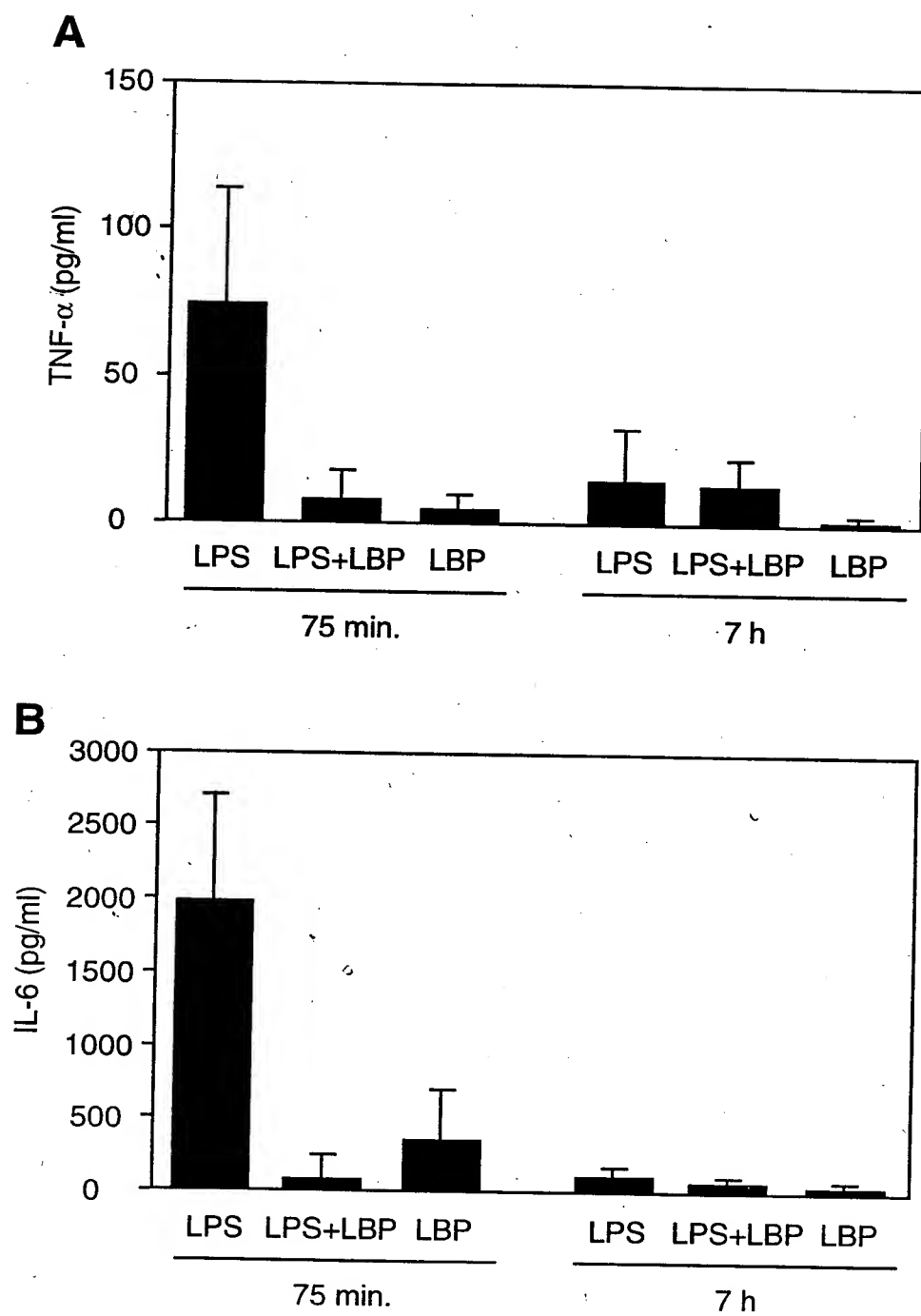


Fig. 5

11.07.97

15

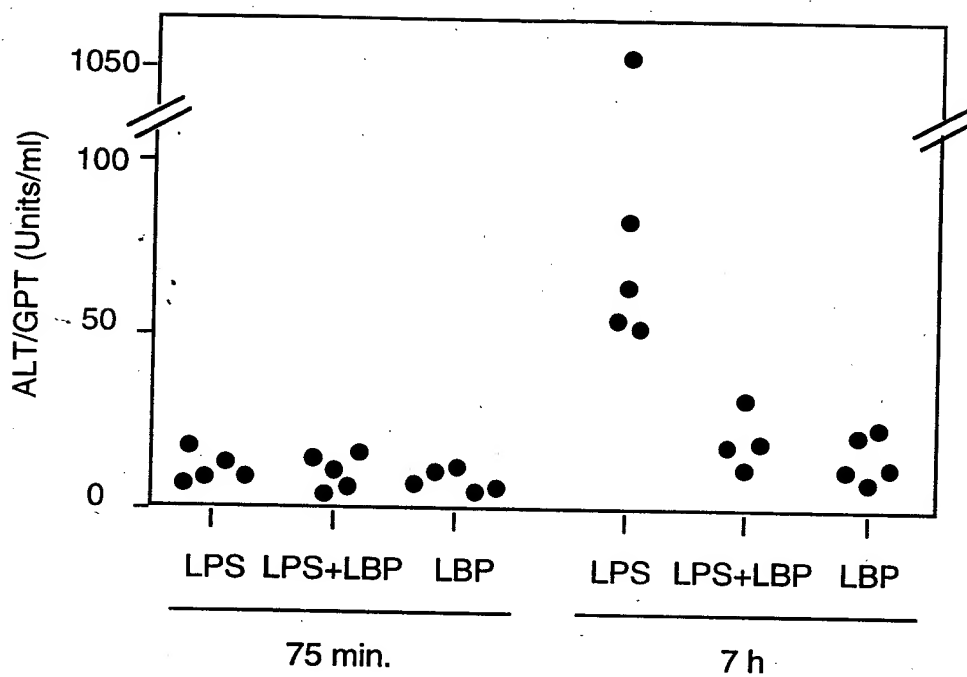


Fig. 6

11.07.97

16

12

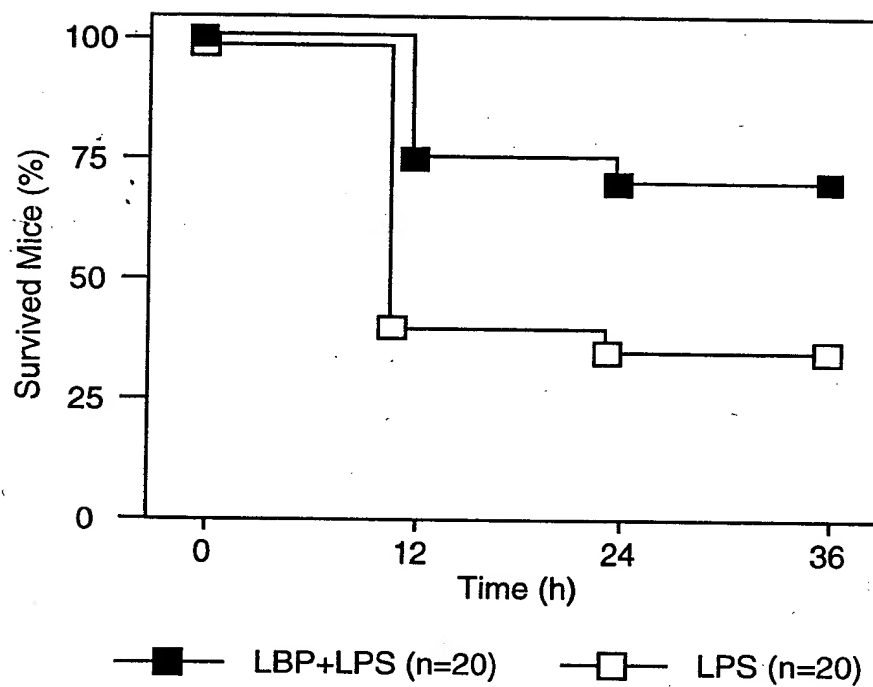


Fig. 7